

D.7.4 Test verschiedener Wachstumsbedingungen für die Überexpression des Nitrit-reduktase-Gens

Um die optimalen Bedingungen der Expression zu etablieren, wurden verschiedene Versuche hauptsächlich mit dem Klon NR3/5 durchgeführt. Es stellte sich rasch heraus, dass in großen Mengen inaktive NirK produziert wurde. Vermutlich die starke Überproduktion des rekombinanten Proteins war kontraproduktiv für den Einbau des Kupfers, weshalb versucht wurde, die Expression zu drosseln. Dazu wurden Testreihen mit verschiedenen Mengen des Induktors IPTG durchgeführt. Es wurden Endkonzentrationen in der Kultur von 1 mM bis 0,0001 mM getestet. In Abbildung 39 sind die Wachstumskurven von bei 28 °C gezogenen Kulturen induziert mit 0,1-0 mM IPTG und die entstandenen Proteinmengen nach einer bzw. zwei Stunden nach der Induktion dargestellt. Gut zu sehen ist, dass die Kultur die mit 0,1 mM IPTG induziert wurde in ihrem Wachstum ab ca. einer Stunde nach Induktion deutlich gehemmt ist. Alle anderen Kulturen schienen ähnlich gut zu wachsen wie die nicht-induzierte Kontrollkultur. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel erkennt man, dass nur in der mit 0,1 mM IPTG induzierten Kultur das rekombinante Protein in einer erkennbaren Menge produziert wurde, und zwar schon ab einer Stunde nach Induktion (Abb. 39 b). Für alle weiteren Versuche wurden deshalb die Kulturen mit 0,1 mM IPTG induziert.

Bei den Anzuchtmedien wurde von dem anfangs verwendeten 2 x YT auf LB und später auf M9-Minimalmedium gewechselt. Zweck war es, eventuelle Inkorporationen von anderen Metallen statt des Kupfers zu verhindern, indem der Metallanteil im Medium gesenkt und der Kupferanteil durch Zugabe von bis zu 100 μM CuSO_4 erhöht wurde. Noch höhere Konzentrationen an Kupfer im Medium wären tödlich für die *E. coli*-Zellen gewesen und wurden deshalb nicht getestet. Bei direkter Zugabe von 100 μM CuSO_4 beim Start der Kultur zeigte sich unmittelbar ein deutlich verlangsamtes Wachstum. Trotz aller Versuche konnte weder photometrisch noch im Aktivitätstest ein korrekter Einbau des Kupfers bestätigt werden.

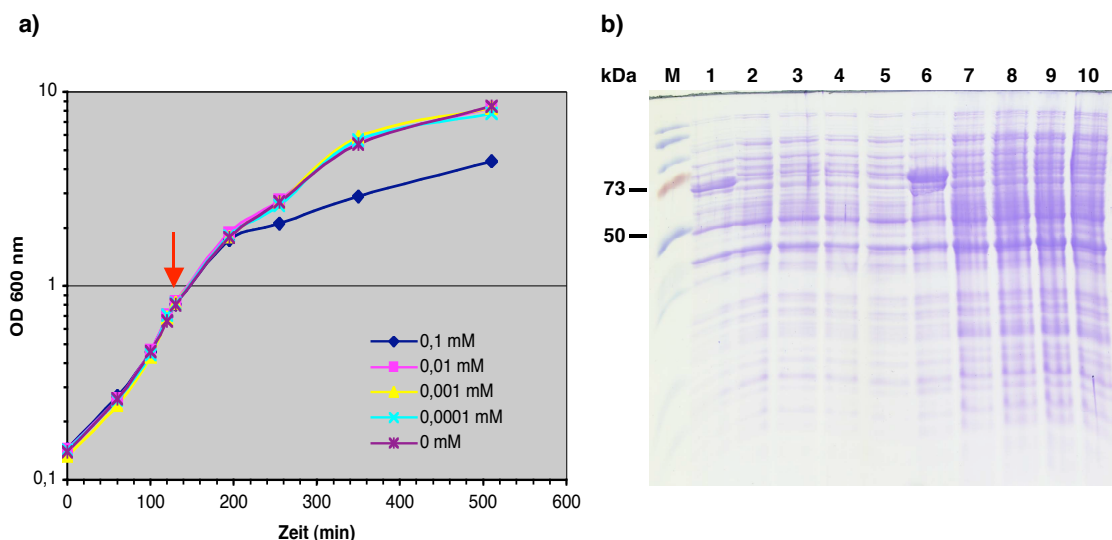


Abbildung 39: Bestimmung der optimalen IPTG-Menge für die Induktion. (a) Wachstumskurven von Konstrukt NR3/5 induziert mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen. Gleichzeitig mit der Induktion (OD 0,8, Zeitpunkt 130 Minuten, roter Pfeil) wurden auch bei allen Kulturen 50 μM CuSO_4 zugesetzt. (b) SDS-Polyacrylamidgel mit Zellextrakten der Kulturen, 1 Stunde (Spuren 1-5: 0,1 mM-0 mM IPTG; wie in a) bzw. 2 Stunden (Spuren 6-10, 0,1 mM-0 mM IPTG) nach Induktion. Marker: *Prestained Protein Ladder*, ~10-180 kDa.

Auch Expressionen bei niedrigeren Temperaturen oder mit Temperaturabsenkung kurz vor Induktion führten zu keinem positiven Ergebnis (nicht gezeigt). Ebenfalls erfolglos waren Versuche, die Kupferzentren durch Zugabe von CuCl oder CuSO₄-Lösungen nachträglich zu formieren. Auch musste vor dem anschließenden Enzymtest das sich in der Lösung befindliche Kupfer durch Dialyse entfernt werden, um einen störenden Einfluss auf die Messungen zu verhindern.

D.7.5 Reinigung der heterolog exprimierten Proteine

Für die Reinigung der rekombinanten Proteine wurden verschiedene Verfahren angewendet. Das hauptsächlich für Reinigungsversuche verwendete Konstrukt NR3/5 hatte ein fusioniertes Hexa-Histidin-*tag*, das die Reinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie erlaubte. Es wurden zwei Varianten dieser Reinigung über Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA) in Säulchen und im *batch*-Verfahren getestet. Gezeigt sind in Abbildung 40 die Fraktionen einer Reinigung von NR3/5 über eine Ni-NTA-Säule. Trotz der vorher mittels eines Bradford-Tests bestimmten und auf die Matrix angepassten Proteinmenge ist sowohl im Durchfluss (Spur 4) als auch in der 1. Waschfraktion (Spur 5) des Säulchens das gewünschte ca. 56 kDa große Protein zu sehen. Dies deutet auf eine Überschreitung der Säulenkapazität hin. Trotzdem sind die Reinigungsergebnisse, die bei den Elutionen 1-5 (Spuren 6-10) erzielt wurden recht gut. Der Anteil des gewünschten Proteins dürfte über 80% des Gesamtproteins in der Lösung betragen. Die so gereinigten Proteine wurden für Aktivierungs- und Rückfaltungsversuche verwendet. Im Gegensatz zum Säulenverfahren waren die im *batch*-Verfahren erzielten Reinigungsergebnisse unbefriedigender.

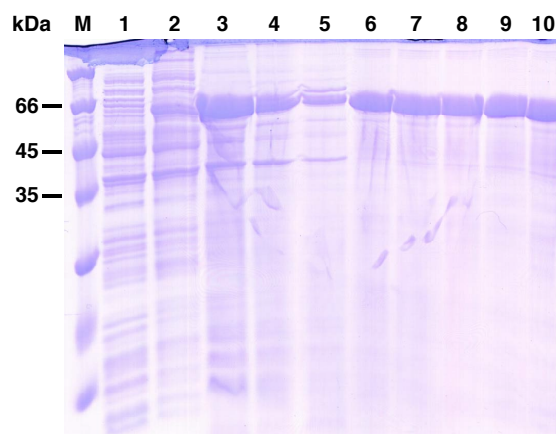


Abbildung 40: Reinigung des Konstrukts NR3/5 über Metallchelataffinitätschromatographie. Zu sehen sind auf dem SDS-Polyacrylamidgel die Zellextrakt zum Zeitpunkt der Induktion (Spur 1), die 20.000 rpm-Fraktion (Spur 2) und die Cytoplasmafraktion (Spur 3) nach Zellaufschluss sowie die verschiedenen Fraktionen der Reinigung: Säulendurchfluss (Spur 4), 1. Waschfraktion (Spur 5) und die 1.-5. Elution (Spuren 6-10). Marker: *Protein Molecular Weight Marker*.

Das Konstrukt NR3/5N, bei dem kein His-tag fusioniert worden war, wurde mittels einer Gelfiltration gereinigt. Hierdurch sollte gleichzeitig eine Größenbestimmung erfolgen, um die ungefähre Anzahl an zusammengelagerten Untereinheiten zu ermitteln. Daran wäre festzustellen, ob sich z.B. ein Homotrimer in *E. coli* ausgebildet hatte. Die Reinigung von NR3/5N ist in Abbildung 41 gezeigt. Unter a) ist das Elutionsprofil zu sehen, wobei das Volumen an Elutionspuffer gegen die OD bei 280 nm aufgetragen wurde. Die Fraktionen wurden so gesammelt, dass auftretende Absorptionsmaxima, d.h. hohe Mengen gleichzeitig eluierter Proteine möglichst in einer Fraktion zusammengeführt wurden. Fraktion 2 umfasst alle Proteine die bei der Ausschlussgröße der Säule liefen, d.h. nicht retardiert wurden. Ungefähr in Fraktion 5 wurden Proteine eluiert, deren Größe dem von NR3/5N entsprachen (ca. 56 kDa), was anhand von bereits mit dieser Säule durchgeführten Eichreihen bestimmt worden war (persönliche Mitteilung von Tim Urich). Auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 41 b) wurden Proben aller Fraktionen aufgetragen und analysiert. Gut zu sehen ist, dass in allen Fraktionen von der Ausschlussgröße bis zur Fraktion in der das Monomer eluieren sollte (Fraktionen 2-5) NR3/5N nachweisbar war. Zusammengekommen bedeutet dies, dass NR3/5N wenn es in *E. coli* exprimiert wurde von der monomeren Form bis zu Aggregaten mit hohen Anzahlen von Untereinheiten vorlag.

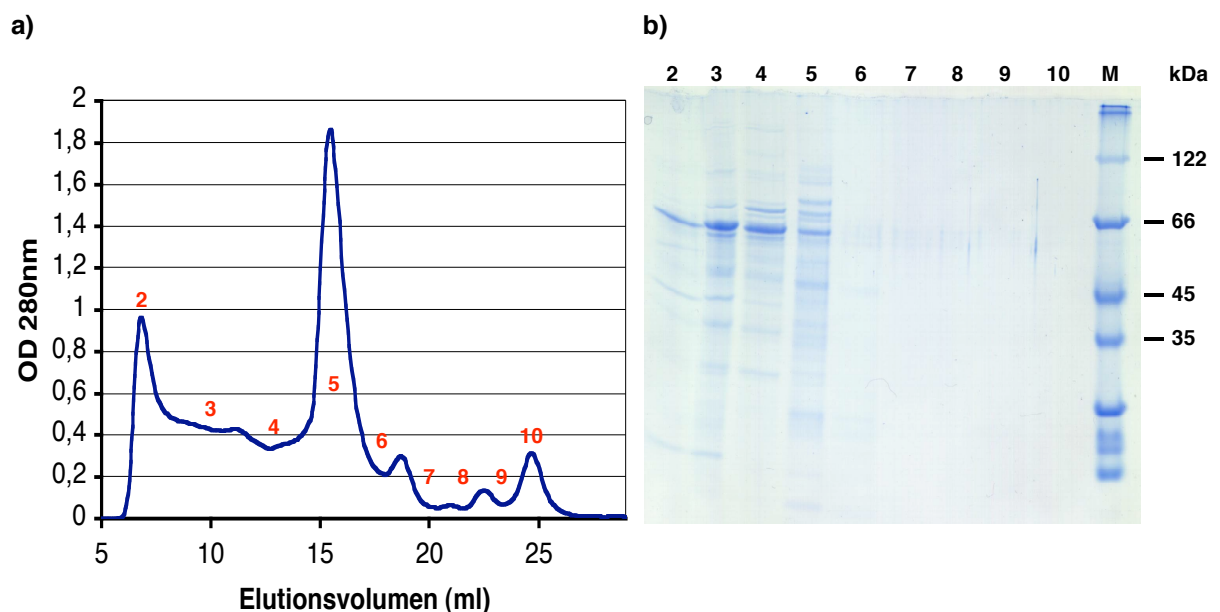


Abbildung 41: Reinigung von NR3/5N durch Gelfiltration. (a) Elutionsprofil der Superose 6-Säule: die OD bei 280 nm wurde gegen das Volumen an Elutionspuffer aufgetragen. Rot markiert sind die gesammelten Fraktionen. (b) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Elutionsfraktionen (Nummerierung stimmt mit den Fraktionsnummern überein). Marker: *Protein Molecular Weight Marker*.

D.7.6 Versuche zur Expression der Nitritreduktase im Periplasma

Nach Expression der Nitritreduktase im Cytoplasma von *E. coli* konnte kein aktives Protein erhalten werden. Höchstwahrscheinlich war ein Kupfereinbau nicht erfolgt. Da dissimilatorische Kupfer-haltige Nitritreduktasen in anderen Organismen periplasmatisch